

**(54) HIGHLY UNSATURATED FATTY ACID AND PRODUCTION OF LIPID CONTAINING THE ACID**

(11) 6-153970 (A) (43) 3.6.1994 (19) JP  
 (21) Appl. No. 4-305523 (22) 16.11.1992  
 (71) SUNTORY LTD (72) KENICHI HIGASHIYAMA(5)  
 (51) Int. Cl<sup>s</sup>. C12P7/64//(C12P7/64,C12R1/645)

**PURPOSE:** To produce a highly unsaturated fatty acid and a lipid containing the acid in high efficiency by using a microbial strain belonging to the subgenus *Mortierella*, genus *Mortierella*.

**CONSTITUTION:** A highly unsaturated fatty acid and a lipid containing the acid are produced by the aerobic culture of a microbial strain belonging to the subgenus *Mortierella*, genus *Mortierella* in a liquid medium. In the above process, the dissolved oxygen concentration in the culture liquid is maintained to 5-28ppm. The production of the highly unsaturated fatty acid is increased to about 1.2-1.8 times by the use of the oxygen-feeding condition of the present invention compared with conventional fermentation condition.

**(54) PRODUCTION OF MONOGLYCERIDE BY LIPASE**

(11) 6-153971 (A) (43) 3.6.1994 (19) JP  
 (21) Appl. No. 3-70117 (22) 2.4.1991  
 (71) MITSUBISHI KASEI CORP (72) CHIAKI HATANAKA(4)  
 (51) Int. Cl<sup>s</sup>. C12P7/64,C12N11/00

**PURPOSE:** To obtain a monoglyceride useful as an emulsifier, etc., for foods, cosmetics and pharmaceuticals by including and fixing a lipase by plasma polymerization and subjecting a fatty acid and glycerol to enzymatic reaction by using the obtained immobilized enzyme having excellent specificity and excellent heat-resistance.

**CONSTITUTION:** A polymerization flask is charged with acrylamide, N,N'-methylenebisacrylamide and water, incorporated with a lipase, frozen with liquid nitrogen, deaerated to a vapor pressure of  $\leq 0.1$  Pa and subjected to plasma polymerization by passing a high-frequency electric current of 10KHz with aluminum electrodes for 90 sec to effect the glow discharge. The lipase is included and immobilized by the obtained polymer. The obtained powdery immobilized enzyme is put into a liquid mixture of a fatty acid (e.g. oleic acid) and glycerol and subjected to enzymatic reaction at 37°C for 48hr to obtain the objective monoglyceride useful as an emulsifier for foods, cosmetics, pharmaceuticals, etc., in high efficiency without using particular raw materials and enzymes by the use of the immobilized enzyme having high monoglyceride specificity and excellent heat-resistance.

**(54) PRODUCTION OF OIL AND FAT CONTAINING SPHINGOMYELIN**

(11) 6-153972 (A) (43) 3.6.1994 (19) JP  
 (21) Appl. No. 4-341070 (22) 30.11.1992  
 (71) NIPPON OIL & FATS CO LTD (72) YUKIHISA TANAKA(2)  
 (51) Int. Cl<sup>s</sup>. C12P13/02//(C12P13/02,C12R1/01)

**PURPOSE:** To obtain a oil and fat containing a sphingomyelin useful e.g. as a raw material for emulsion stabilizer for cosmetics and pharmaceuticals in large quantity at a low cost by culturing a mold belonging to the genus *Entomophthora* to effect the accumulation of sphingomyelin in the microbial cell in high concentration and collecting the substance from the cell.

**CONSTITUTION:** Exclusively the spores of a mold belonging to the genus *Entomophthora* (e.g. *Entomophthora muscae*) are suspended in sterilized water and cultured for 3 days. The obtained cells are used as seed cells, inoculated to a medium and cultured under shaking at 28°C for 4 days to accumulate a sphingomyelin in the microbial cell in high concentration. The cells are collected and extracted with a chloroform-methanol mixture (1:2 v/v) under stirring to obtain an oil and fat containing the sphingomyelin. The extract is incorporated with acetone and cooled with ice for 1 hr. The whole liquid is subjected to centrifugal separation, the precipitate is collected, dissolved in ether and stirred for 1 hr and the precipitate is separated by filtration to obtain a large amount of the sphingomyelin at a low cost.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-153970

(43)公開日 平成6年(1994)6月3日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>  
C 12 P 7/64  
// (C 12 P 7/64  
C 12 R 1:645)

識別記号 広内整理番号  
9282-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数4(全7頁)

(21)出願番号

特願平4-305523

(22)出願日

平成4年(1992)11月16日

(71)出願人 000001904

サントリー株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

(72)発明者 東山 堅一

大阪府大阪市都島区友渕町1-5-1-205

(72)発明者 村上 克之

大阪府池田市石橋2-13-22 サントリー  
石橋ハイツ109

(72)発明者 辻村 英雄

京都府長岡市友岡3-4-6

(74)代理人 弁理士 青木 朗 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高度不飽和脂肪酸及びこれを含有する脂質の製造方法

(57)【要約】

【目的】 モルティエレラ (Mortierella) 属のモルティエレラ (Mortierella) 亜属に属する微生物を利用して効率よく高度不飽和脂肪酸及びこれを含有する脂質を製造する方法を提供する。

【構成】 モルティエレラ (Mortierella) 属のモルティエレラ (Mortierella) 亜属に属する微生物を液体培地中で通気培養して、高度不飽和脂肪酸及びこれを含有する脂質を製造する方法において、培養液中の溶存酸素濃度を5~28ppmに維持することを特徴とする、高度不飽和脂肪酸又はこれを含有する脂質の製造方法。

【効果】 通常の発酵条件に比べて、本発明の酸素供給条件により、高度不飽和脂肪酸の生産量がおよそ1.2~1.8倍に増加する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 モルティエレラ (Mortierella a) 属のモルティエレラ (Mortierella) 亜属に属する微生物を液体培地で通気培養して、高度不飽和脂肪酸及びこれを含有する脂質を製造する方法において、培養液中の溶存酸素濃度を5~28ppmに維持することを特徴とする、高度不飽和脂肪酸又はこれを含有する脂質の製造方法。

【請求項2】 さらに、培養時の培養槽内の圧力を加圧状態に維持することを特徴とする、請求項1記載の高度不飽和脂肪酸又はこれを含有する脂質の製造方法。

【請求項3】 さらに、酸素濃度が通常空気より高い酸素富化空気を、通気することを特徴とする、請求項1記載の高度不飽和脂肪酸又はこれを含有する脂質の製造方法。

【請求項4】 培養液中の溶存酸素濃度を5~20ppmに維持することを特徴とする請求項3記載の高度不飽和脂肪酸又はこれを含有する脂質の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、モルティエレラ (Mortierella a) 属のモルティエレラ (Mortierella) 亜属に属する微生物を利用した発酵法による、ω-3系やω-6系、ω-9系等の高度不飽和脂肪酸（以下PUFAとする）又はこれらを含有する脂質を製造する方法に関する。

【0002】 糸状菌であるモルティエレラ属微生物を用いてアラキドン酸（以下、ARAと称する）やジホモニーリノレン酸（以下、DGLAと称する）をはじめとするω-6系PUFAを製造することは既に知られている（特開昭63-044891、特開平1-243992）。又、モルティエレラ属微生物を用いて、低温培養することによりω-3系PUFAであるエイコサペンタエン酸（以下EPAとする）を製造することも知られている（特開昭63-14697）。さらにモルティエレラ属微生物の突然変異株を用いて、ミード酸等のω-9系PUFAを製造することやDGLAを製造することが見い出されている（特願平3-251966、特願平3-251964）。

【0003】 これらの脂肪酸が該菌体内で生産される際の菌体内での脂肪酸不飽和化反応は、酸素添加反応による好気的不飽和化反応であり、培養液中の溶存酸素濃度（以下DOとする）はPUFA生産における重要な因子と考えられる。糸状菌によるPUFA生産に及ぼすDOの影響については、2~3ppmの比較的低いDOの範囲内で検討された報告はあるが（Appl. Microbiol. Biotechnol., 37, 18 (1992)）、常圧下での通常空気を通気した場合の飽和DOに近い値、またはそれを越える高いDO条件下などの糸状菌によるPUFA生産について詳細に検討された報告はない。

【0004】 一方、モルティエレラ属のような糸状菌を用いて、液体培地で発酵生産を行なう場合、往々にして菌体増殖による培養液粘度の増加とそれに伴う酸素供給の不足が起こる（Biotechnol. Bioeng., 37, 960 (1991)）。その対策として、一般的には培養槽の攪拌回転数を上げる等の手段が知られているが、それは一般にせん断力に弱いと言われている糸状菌の培養には適しておらず、このことが糸状菌のスケールアップに伴う生産性低下の一因となっている（J. Ferment. Technol., 56, 374 (1978), Biotechnol. Bioeng., 35, 1011 (1990)）。

【0005】 このような糸状菌に対して酸素供給を十分に行なう方策として、培養槽の形状改良の試み（Biotechnol. Lett., 14, 491 (1992), Appl. Microbiol. Biotechnol., 37, 32 (1992), Appl. Microbiol. Biotechnol., 37, 37 (1992), Biotechnol. Bioeng., 32, 835 (1988)）などが成されているが、多目的に使用される工業規模での培養層においては、その形状変更は実用上不可能である。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明はモルティエレラ亜属微生物によるPUFA生産効率とDOの関係を解明し、微生物に損傷を与えることなく、工業規模でも容易に実施できる酸素供給方法を用いて同微生物による効率的なARA、DGLAをはじめとするPUFAまたはこれらを含有する脂質の製造方法を提供しようとするものである。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は上記の課題を解決するため、DOと目的とするPUFAの生産量との関係を詳細に検討した結果、モルティエレラ亜属の微生物を用いてPUFAを製造する場合、液体培養時に、培養液中のDOを5~28ppmに維持すれば、目的物であるPUFAを効率的に生産できること、且つ微生物を損傷することなく、簡単に酸素供給する方法として培養槽加圧法、および酸素富化空気通気法が有効であることを見出し、本発明を完成するに至った。

## 【0008】

【具体的な説明】 本発明において、モルティエレラ属のモルティエレラ亜属に属する微生物であれば、すべて使用することができ、例えば、モルティエレラ・エロングタ (Mortierella elongata)、モルティエレラ・エキシグア (Mortierella exigua)、モルティエレラ・ヒグロフィラ (Mortierella hygrophila)、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) 等の菌を挙げることができる。

【0009】 さらに具体的には、モルティエレラ・エロングタ (Mortierella elongata) IFO8570、モルティエレラ・エキシグア (Mortierella exigua) IFO8571、モル

ティエレラ・ヒグロフィラ (Mortierella hygrophila) IFO 5941、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) IFO 8568 等の菌株を挙げることができ、これらはいずれも、財団法人醸酵研究所からなんら制限なく入手することができる。また土壤分離菌株であるモルティエレラ・エロンガタ (Mortierella elongata) SAM 0219 (微工研条寄1239号) を使用することもできる。しかしながらこれらの菌に限定されるものではない。

【0010】また本発明において使用できるモルティエレラ亜属に属する微生物の中には、その突然変異株も含まれる。例えばモルティエレラ亜属に属する微生物に突然変異操作を行ない、不飽和化酵素や炭素鎖延長化酵素の活性が低下または欠損あるいは向上した変異株を使用することができる。さらに具体的には、 $\Delta 5$  不飽和化酵素活性が低下した変異株としてモルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) SAM 1860 (微工研条寄3589号)、 $\Delta 12$  不飽和化酵素活性が低下した変異株としてモルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) SAM 1861 (微工研条寄3590号) 等の変異株を挙げることができる。しかしながらこれらの菌に限定されるものではない。

【0011】突然変異操作としては、放射線 (X線、 $\gamma$ 線、中性子線) や紫外線を照射したり、高熱処理を行ったり、また微生物を適当なバッファー中などに懸濁し、変異源を加えて一定時間インキュベート後、適当に希釈して寒天培地に植菌し、変異株のコロニーを得るといった操作を行うことができる。

【0012】変異源としては、ナイトロジエンマスター、メチルメタンサルホネート (MMS)、N-メチル-N'-ニトロソ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 等のアルキル化剤や、5-ブロモウラシル等の塩基類似体や、マイトイシンC等の抗生物質や、6-メルカプトブリノ等の塩基合成阻害剤や、プロフラビン等の色素類や、4-ニトロキノリン-N-オキシド等のある種の発癌剤や塩化マンガン、重クロム酸カリウム、亜硝酸、ヒドログリシン、ヒドロキシルアミン、ホルムアルデヒド、ニトロフラン化合物類などを挙げることができ、使用する微生物は、生育菌体 (菌糸など) でも良いし、胞子でも良い。

【0013】本発明に使用される菌株を培養するためには、その菌株の胞子、菌子、又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地に接種し培養する。炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されているものが、いずれも使用できるが、これらに限られるものではない。

【0014】窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンスティプリカ一、大豆蛋白等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源を用いることができる。この他必要に応じリン酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅等の無機塩及びビタミン等も微量栄養源として使用できる。

【0015】これらの培地成分は微生物の成育を害しない濃度であれば特に制限しない。実用上一般に、炭素源は0.1~30重量%、好ましくは1~10重量%、窒素源は0.01~5重量%、好ましくは0.1~2重量%の濃度とするのが良い。培養温度は5~40°C、好ましくは20~30°Cとし、EPAを製造する際には好ましくは10~20°Cとする。さらに培地のpHは4~10、好ましくは6~9として培養を行う。培養は通常2~10日間行う。

【0016】また、本発明におけるPUFAの生産を促進するため、目的とするPUFAの基質を培地に添加することができる。たとえばω-6系PUFAの基質としては、テトラデカン、ヘキサデカン、オクタデカン等の炭素数12~20の炭化水素、テトラデカン酸、ヘキサデカン酸、オクタデカン酸等の炭素数12~20の脂肪酸、又はその塩 (例えばナトリウム塩またはカリウム塩)、脂肪酸エステル、又は脂肪酸を構成成分として含む油脂 (例えばオリーブ油、大豆油、綿実油、ヤシ油) 等を挙げができる。

【0017】本発明において、PUFAの収量を向上させるため、培養中のある一定期間、好ましくは全培養期間中に、培養液中のDOを5~28ppmに制御しつつ培養する。このような比較的高いDOを、微生物に損傷を与えることなく維持するためには次の2つの方法が有効である。一つは、培養槽への通気ガスの圧力調整及び培養槽通気出口の開度調整によって培養槽内全体の圧力を上げて通常空気を通気する方法であり、この際、培養槽内の圧力は0.4~3kg/cm<sup>2</sup>G、好ましくは0.8~2kg/cm<sup>2</sup>Gにするとよい。

【0018】また別の方法としては、通常空気に純酸素又は酸素濃度の高い (酸素濃度が21%より高い) ガスを混合するか、あるいは通常空気から窒素等の酸素以外の成分を一部又は全て除去した酸素富化空気を、培養槽に通気することにより、所定量の酸素を供給することができる。この際、酸素富化空気の酸素濃度は25~77%、好ましくは25~54%に設定するとよい。またこの方法を実施する場合、培養液中のDOは5~20ppmに制御しつつ培養することが好ましい。さらにこれらの方法は単独でも、または併用してあるいは組み合せて行なうことができる。なおこれらの方法において、培養槽への通気は通常、0.1vvm (単位vvm: N1/1-b root h/min、以下すべて同様) 以上、好ましくは

0. 5~2 vvm の範囲で行なう。

【0019】本発明では、目的のPUFAを製造するために、必要であれば従来から知られている酵素活性阻害剤や活性化剤を用いることができる。このようにして培養して、菌体内に目的とするPUFAを含有する脂質が生成蓄積される。この培養菌体から、通常の方法により目的とするPUFAの採取を行う。

#### 【0020】

【実施例】次に、実施例により、この発明をさらに具体的に説明する。

実施例1. グルコース2%、酵母エキス1%を含む培地(pH6.3)100mLを500mLエルレンマイヤーフラスコに入れ、120℃で20分殺菌した。モルティエレラ・アルピナ(*Mortierella alpina* a)IFO8568を1白金耳植菌し、レシプロシェーカー(100rpm)により28℃で4日間振盪培養し、これを前培養液とした。本培養は、前培養と同じ組成の培地を50L容培養槽に25L仕込み、120℃で20分殺菌・冷却後、前培養液500mLを接種した。

【0021】本発明法では、培養液のDOが培養の全期\*20

10

\*間を通じてそれぞれ6~11ppm、10~15ppm、14~19ppmになるように、通気中の酸素濃度を調整した。ちなみに、この場合の酸素濃度は各々約30%、約41%、約51%であった。コントロールは通常の空気(酸素濃度21%)を通気した。なお、いずれの場合も培養温度28℃、攪拌回転数200rpm、通気量1vvm、槽内常圧の条件で7日間培養を行なった。また、培養1~5日目には、各々1日当たりグルコース1% (対プロス)を添加し、必要に応じて消泡剤を添加して培養した。培養後濾過により菌体を回収し、十分に水洗した後、105℃で2時間静置して乾燥菌体を得た。

【0022】乾燥菌体より、クロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いるBriegh&Dyerの抽出法によって総脂質を抽出、さらにこれを無水メタノール-塩酸(95:5)を用いて20℃にて3時間処理する事によってメチルエステル化し、エーテルで抽出して脂肪酸メチルを得た。得られた脂肪酸メチルをガスクロマトグラフィーで分析した。表1にその結果を示す。

#### 【0023】

表 1

通気ガス酸素濃度(%)	酸素富化空気				通常空気
	30	41	51	21	
DO値					
培養液中の最低DO(ppm)	6.6	10.5	14.2	1.1	
培養液中の最高DO(ppm)	10.5	14.9	18.0	7.8	
培養成績					
乾燥菌体(g/L)	18.9	19.8	19.2	16.6	
総脂肪酸(g/L)	9.17	9.52	9.30	6.55	
ARA(g/L)	3.77	4.01	3.80	2.61	
DGLA(g/L)	0.39	0.38	0.37	0.20	

【0024】表1から明らかなようにコントロールに比べ、DOを6~11ppmに制御の場合、ARAで44%、DGLAで95%、DOを10~15ppmに制御の場合、ARAで54%、DGLAで90%、DOを14~19ppmに制御の場合、ARAで46%、DGLAで85%、各々生産量が増大した。

【0025】実施例2. グルコース2%、酵母エキス1%を含む培地(pH6.3)を50L容培養槽に25Lで仕込み、120℃で40分殺菌、冷却後、実施例1と同様に調製したモルティエレラ・エキシグア(*Mortierella exigua*)IFO8571の前培養液を500mL接種した。本発明法では培養液のDOが、培養の全期間を通じて5~10ppm、11~16ppm、

17~22ppm、23~28ppmの範囲となるように培養槽内の圧力を調整した。

【0026】ちなみに、この場合の内圧は各々約0.5kg/cm<sup>2</sup>G、約1.2kg/cm<sup>2</sup>G、約2.0kg/cm<sup>2</sup>G、約2.6kg/cm<sup>2</sup>Gであった。コントロールは常圧で培養した。なお何れの場合も、培養温度28℃、攪拌回転数200rpm、通常空気1vvm通気の条件で7日間の培養を行なった。また、実施例1と同様に、培養1~5日目のグルコース添加、必要に応じた消泡剤添加を行なった。培養後、実施例1と同様の方法で菌体回収および脂肪酸メチルの調製を行い、ガスクロマトグラフィーで分析した。表2にその結果を示す。

#### 【0027】

表 2

	本発明法	コントロール
培養槽内圧力(kg/cm <sup>2</sup> G)	0.5	1.2 2.0 2.6 0

7	8
培養中の最低DO (ppm)	5.0
培養中の最高DO (ppm)	9.8
乾燥菌体 (g/L)	18.9
総脂肪酸 (g/L)	7.46
ARA (g/L)	3.06
DGLA (g/L)	0.32
	12.5 17.0 23.2 1.1
	15.4 21.3 27.5 7.8
	20.7 21.1 17.5 16.2
	8.20 8.25 7.01 6.56
	3.63 3.72 2.86 2.55
	0.41 0.43 0.31 0.24

【0028】表2から明らかなようにコントロールに比べ、DOを5~10 ppmに制御の場合、ARAで20%、DGLAで33%、DOを11~16 ppmに制御の場合、ARAで42%、DGLAで71%、DOを17~22 ppmに制御の場合、ARAで46%、DGLAで79%、DOを23~28 ppmに制御の場合、ARAで12%、DGLAで29%、各々生産量が増大した。

【0029】実施例3、グルコース0.5%、オリーブ油2%、酵母エキス1%を含む培地 (pH 6.0) を50 L容培養槽に25 L仕込み、120°Cで20分殺菌、冷却後、実施例1と同様に調製したモルティエレラ・エロングタ (Mortierella elongata)

I F O 8 5 7 0 の前培養液500 mLを接種した。本実施例では、培養液のDOが培養の全期間を通じて11~11

\* 6 ppm、25~30 ppm、30~35 ppm になるように、通気中の酸素濃度を調整した。ちなみに、この場合の酸素濃度は各々約43%、約81%、約95%であった。コントロールは通常の空気 (酸素濃度21%) を通気した。

【0030】なお、いずれの場合も培養温度28°C、攪拌回転数200 rpm、通気量1 vvm、槽内常圧の条件で7日間培養を行なった。また、培養1~5日目には、各々1日当たりグルコース1% (対プロス) を添加し、必要に応じて消泡剤を添加して培養した。培養後、実施例1と同様の方法で菌体回収および脂肪酸メチルの調製を行い、ガスクロマトグラフィーで分析した。表3にその結果を示す。

### 【0031】

表 3

通気ガス酸素濃度 (%)	酸素富化空気通気			通常空気通気
	43	81	95	21
DO値				
培養液中の最低DO (ppm)	11.0	25.4	31.0	1.4
培養液中の最高DO (ppm)	15.3	29.9	34.4	7.6
培養成績				
乾燥菌体 (g/L)	19.8	15.6	12.3	16.7
総脂肪酸 (g/L)	9.52	7.49	5.88	7.98
ARA (g/L)	3.83	2.85	2.00	3.03
DGLA (g/L)	0.42	0.33	0.25	0.36

【0032】表3から明らかなように、本発明法でDOを11~16 ppmに制御した場合、コントロールに比べARAで26%、DGLAで17%生産量が増大した。しかし、DOを25~30 ppmに制御した場合はARAで6%、DGLAで8%の生産量減少、さらに、DOを30~35 ppmに制御した場合はARAで34%、DGLAで31%の生産量減少が起こった。

【0033】実施例4、グルコース0.5%、オリーブ油2%、酵母エキス1%を含む培地 (pH 6.0) を50 L容培養槽に25 Lで仕込み、120°Cで40分殺菌、冷却後、実施例1と同様に調製したモルティエレラ・ヒグロフィラ (Mortierella hygrophila) I F O 5 9 4 1 の前培養液を500 mL接種した。

本実施例では培養液のDOが、培養の全期間を通じて9~13 ppm、28~33 ppm の範囲となるように培養槽内の圧力を調整した。

【0034】ちなみに、この場合の内圧は約0.9 kg/cm<sup>2</sup>G、約3.2 kg/cm<sup>2</sup>Gであった。コントロールは常圧で培養した。なお何れの場合も、培養温度28°C、攪拌回転数200 rpm、通常空気1 vvm 通気の条件で7日間培養を行なった。また、実施例1と同様に、培養1~5日目のグルコース添加、必要に応じた消泡剤添加を行なった。培養後、実施例1と同様の方法で菌体回収および脂肪酸メチルの調製を行い、ガスクロマトグラフィーで分析した。表4にその結果を示す。

### 【0035】

表 4

槽内加圧	槽内常圧
------	------

9

培養槽内圧力 (kg/cm <sup>2</sup> G)	0.9	3.2	0
培養中の最低DO (ppm)	9.2	28.5	1.4
培養中の最高DO (ppm)	12.9	32.2	7.5
乾燥菌体 (g/L)	22.3	16.4	17.2
総脂肪酸 (g/L)	10.9	8.02	8.41
ARA (g/L)	3.92	2.49	2.78
DGLA (g/L)	0.90	0.67	0.69

【0036】表4から明らかなように、本発明法でDOを9~13ppmに制御した場合、コントロールに比べARAで41%、DGLAで30%生産量が増大した。しかし、DOを28~33ppmに制御した場合はARAで10%、DGLAで3%の生産量減少が起こった。

【0037】実施例5. グルコース1.8%、酵母エキス1%、オリブ油0.5%を含む培地(pH6.3)を50L容培養槽に25Lで仕込み、120℃で40分殺菌、冷却後、実施例1と同様に調製したモルティエレラ・エロンガタ(*Mortierella elongata* a) SAM1860の前培養液を500mL接種した。本発明法では培養液のDOが、培養の全期間を通じて12~20

\*~17ppmの範囲となるように、酸素富化空気と培養槽内の圧力で調整した。

【0038】ちなみに、この場合の酸素濃度は約25%、内圧は約0.8kg/cm<sup>2</sup> Gであった。コントロールは通常の空気を常圧で通気した。なお何れの場合も、培養温度28℃、攪拌回転数200rpm、通気量1vvm通気の条件で7日間培養を行なった。また、実施例1と同様に、培養1~5日目のグルコース添加、必要に応じた消泡剤添加を行なった。培養後、実施例1と同様の方法で菌体回収および脂肪酸メチルの調製を行い、ガスクロマトグラフィーで分析した。表5にその結果を示す。

【0039】

表 5

	I (本発明法)	II (コントロール)
培養中の最低DO (ppm)	13.1	1.6
培養中の最高DO (ppm)	16.6	7.7
乾燥菌体 (g/L)	22.3	17.2
総脂肪酸 (g/L)	10.2	8.03
DGLA (g/L)	3.72	2.94
ARA (g/L)	0.95	0.80

表5から明らかなように、本発明法の場合、コントロールに比べてDGLAで27%、ARAで19%生産量が増大した。

【0040】実施例6. グルコース0.5%、オリーブ油2%、酵母エキス1%を含む培地(pH6.0)を50L容培養槽に25L仕込み、120℃で20分殺菌、冷却後、実施例1と同様に調製したモルティエレラ・エロンガタ(*Mortierella elongata* a) SAM0219の前培養液500mLを接種した。本発明法では、培養液のDOが培養の全期間を通じて22~27ppmになるように、通気中の酸素濃度と培養槽内圧力を調整した。

【0041】ちなみに、この場合の酸素濃度は約29%、内圧は約1.5kg/cm<sup>2</sup> Gであった。コントロールは通常の空気(酸素濃度21%)を常圧で通気した。なお、いずれの場合も培養温度28℃、攪拌回転数200rpm、1vvm通気の条件で7日間培養を行なった。また、培養1~5日目には、各々1日当たりグルコース1% (対プロス)を添加し、必要に応じて消泡剤を添加して培養した。培養後、実施例1と同様の方法で菌体回収および脂肪酸メチルの調製を行い、ガスクロマトグラフィーで分析した。表6にその結果を示す。

【0042】

表 6

	I (本発明法)	II (コントロール)
DO値		
培養液中の最低DO (ppm)	22.5	1.4
培養液中の最高DO (ppm)	26.2	7.6
培養成績		
乾燥菌体 (g/L)	21.4	17.3

11

総脂肪酸 (g/L)	10.5
ARA (g/L)	4.09
DGLA (g/L)	0.63

12

8.13
3.09
0.41

表6から明らかなように、本発明法の場合、コントロールに比べARAで32%、DGLAで54%生産量が増大した。

フロントページの続き

(72) 発明者 新免 芳史  
東京都府中市緑町2-18-9 アルト東府  
中302

(72) 発明者 松元 信也  
大阪府三島郡島本町桜井台8-15  
(72) 発明者 山田 秀明

京都府京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19-1

**(54) PRODUCTION OF DIH<sub>18,20</sub>- $\gamma$ -LINOLEIC ACID AND LIPID CONTAINING THE SAME**

(11) 5-91887 (A) (43) 16.4.1993 (19) JP  
 (21) Appl. No. 3-251964 (22) 30.9.1991  
 (71) SUNTORY LTD (72) HIROSHI KAWASHIMA(3)  
 (51) Int. Cl<sup>s</sup>. C12P7/64//(C12P7/64,C12R1/645)(C12P7/64,C12R1/785)(C12P7/64,C12R1/80)(C12P7/64,C12R1/66)

**PURPOSE:** To easily produce the subject compound in high efficiency exclusively using inexpensive common medium by cultivating a microbial strain capable of producing arachidonic acid and having lowered or depleted  $\Delta 5$ -unsaturation activity.

**CONSTITUTION:** A microbial strain capable of producing arachidonic acid and having lowered or depleted  $\Delta 5$ -unsaturation activity [e.g. mutant of *Mortierella alpina* SAM 1860 (FERM BP-3589)] is cultivated to produce the objective compound or a lipid containing the same. The objective compound can be separated from the lipid e.g. by drying the cultivated microbial cells separated from the cultivation liquid, extracting the cell with an organic solvent under nitrogen gas stream, treating the extract with methanol, etc., extracting the treated product with an organic solvent such as hexane to obtain a mixture of fatty acid esters, separating the ester of the objective compound from the mixture by low-temperature crystallization, etc., and hydrolyzing the ester.

**(54) PRODUCTION OF  $\omega$ -9 HIGHLY UNSATURATED FAITTY ACID AND LIPID CONTAINING THE SAME**

(11) 5-91888 (A) (43) 16.4.1993 (19) JP  
 (21) Appl. No. 3-251966 (22) 30.9.1991  
 (71) SUNTORY LTD (72) HIROSHI KAWASHIMA(2)  
 (51) Int. Cl<sup>s</sup>. C12P7/64//(C12P7/64,C12R1/645)(C12P7/64,C12R1/785)(C12P7/64,C12R1/80)(C12P7/64,C12R1/66)

**PURPOSE:** To obtain the subject compound useful as a precursor for leucotriene 3 group using an inexpensive common medium in high efficiency by cultivating a microbial strain capable of producing  $\omega$ -type highly unsaturated fatty acid.

**CONSTITUTION:** A microbial strain capable of producing  $\omega$ -type highly unsaturated fatty acid [e.g. a mutant of *Mortierella alpina* SAM1861 (FERM BP-3590)] is cultivated to produce the objective compound or a lipid containing the objective compound. The objective compound such as 6,9-octadienoic acid is separated from the cultivation product. The cultivation is carried out preferably at 20-30°C and pH 6-9. The objective compound can be separated from the lipid e.g. by extracting the cultivated microbial cells with an organic solvent, treating the obtained lipid containing the  $\omega$ -9 highly unsaturated fatty acid with methanol, extracting the treated liquid with hexane, etc., to obtain a mixture of methyl esters of various fatty acids, separating various  $\omega$ -type highly unsaturated fatty acid methyl esters from the mixture by low-temperature crystallization, etc., and hydrolyzing the esters.

**(54) PRODUCTION OF OIL AND FAT AND MICROORGANISM THEREFOR**

(11) 5-91889 (A) (43) 16.4.1993 (19) JP  
 (21) Appl. No. 3-272003 (22) 24.9.1991 (33) JP (31) 91p.216426 (32) 2.8.1991  
 (71) SHOWA SANGYO CO LTD (72) TAKASHI YAGI(2)  
 (51) Int. Cl<sup>s</sup>. C12P7/64,C12N1/20//(C12P7/64,C12R1/645)(C12P7/64,C12R1/72)

**PURPOSE:** To facilitate the extraction process and reduce the cost by cultivating a specific yeast in the presence of a fatty acid (alkyl ester), thereby effecting extracellular production of an oil and fat, especially an oil and fat usable as a substitute for cacao fat.

**CONSTITUTION:** A microbial strain belonging to the genus *Trichosporon*, *Saccharomycopsis*, *Candida* or (*Cryptococcus* and capable of producing an oil and fat out of the microbial cell by the cultivation in the presence of a fatty acid (alkyl ester) [e.g. new microbial strain, *Trichosporon* sp. SH45Y (FERM BP-1236)] is cultivated in a medium containing a fatty acid (alkyl ester), and the produced and accumulated oil and fat is separated from the cultivation liquid. The fatty acid alkyl ester is preferably ethyl palmitate, etc., and the fatty acid is preferably oleic acid, capric acid, etc.